

子宮体部低分化型腺癌由来細胞株の樹立と その性状に関する研究

金沢大学医学部産科婦人科学講座 (主任: 西田悦郎教授)

加 藤 三 典

57歳の子宮体部低分化型腺癌患者の摘出腫瘍より培養細胞株を樹立し、その細胞像・増殖パターン・増殖に及ぼす性ホルモンと放射線の影響について検討した。この株細胞は、10% 非働化牛胎児血清 (fetal bovine serum FBS) 添加ハム F12 培地のもとに、37℃、5% 炭酸ガス下で静置培養され、5年以上経過し80代以上に至っている。樹立された細胞株の性状は次のごとくであった。上記培地で培養すると細胞倍加時間は72~140時間であり、位相差顕微鏡による観察では、細胞の形状は類円形~多角形で数石状に増殖し重積する傾向がみられた。また、この株細胞の先天性胸腺欠損雌マウスへの移植により腫瘍形成が認められ、その組織像は原腫瘍とよく類似していた。デキストラン・活性炭 (dextran-coated charcoal, DCC) 処理 FBS 10% 加ハム F12 培地において、細胞増殖に及ぼす各種性ステロイド添加の影響を検索したところ、ホルモン非添加対照群に比し、エストラジオール (estradiol, E₂) の場合には 10^{-10} ~ 10^{-6} M の濃度で増殖促進効果が認められ ($p<0.05$)、その最大効果は 10^{-8} M であった。デヒドロエピアンドロステロン (dehydroepiandrosterone, DHA) の場合には 10^{-10} ~ 10^{-6} M で増殖促進効果を認め ($p<0.05$)、その効果は 10^{-7} M で最大であった。しかし、その細胞増殖促進作用は E₂ の効果を超えるものではなかった。プロゲステロン (progesterone, P) では 10^{-10} M、 10^{-8} M と 10^{-6} M で軽度の増殖抑制効果が認められた ($p<0.05$)。テストステロン (testosterone, T) でも 10^{-10} M~ 10^{-8} M で軽度の増殖抑制効果が認められた ($p<0.05$)。また、放射線感受性については、10グレイ (gray, Gy) の1回照射で照射後19日目に増殖抑制効果がみられた ($p<0.05$)。以上、今回子宮体癌 (低分化型腺癌) 由来の細胞株を樹立し、主として細胞増殖に及ぼす各種性ステロイドの影響を検索した成績から、E₂および DHA は促進的に、TおよびPは抑制的に作用するものと考えられた。

Key words endometrial carcinoma, established cell line, sex steroid hormone, radiation

近年培養法の進歩によって種々の子宮体癌培養細胞株が樹立され^{1)~8)}、それらを利用した研究から細胞の特性が究明されるようになった。さらに、その特性に関する研究成果が臨床の面にも応用され診断治療に役立っている。

子宮体癌は乳癌や前立腺癌と同様にホルモンの標的臓器に発生する癌であることから、エストロゲン (estrogen, E) がその危険因子と考えられており、何らかの原因によるEの相対的な慢性過剰すなわち無抵抗 E (unopposed E) 状態が癌化に密接に関連しているとされている⁹⁾。また、内膜腺癌の癌化に伴って性ステロイドに対する反応性の変化や代謝異常なども生じていることが指摘されている^{10)~12)}。なお、その薬物療法としては、従来より抗E作用に基づくプロゲステロゲン (progestogen) や抗E製剤によるホルモン療法がよく行なわれている^{13)~15)}が、高分化型腺癌の場合には有効でも低分化型腺癌には無効なことが多い¹⁶⁾¹⁷⁾。このようなホルモン応答性がどのような機構で成立しているのかについて関心がもたれ、最近では体癌の増殖調節機構における種々の増殖・抑制因子についても研究がなされている¹⁸⁾¹⁹⁾。

今回、子宮体部低分化型腺癌でエストロゲン受容体 (ER)・プロゲステロン受容体 (progesterone receptor, PR) が存在し、臨床プロゲステロゲン療法が有効であった子宮体癌患者を対象として、まず摘出腫瘍より細胞培養を試み、子宮体癌由来細胞株を樹立しその性状について検討した。さらに、この樹立株細胞を用いて性ステロイドホルモンの細胞増殖に及ぼす影響を中心に検討した。

対象および方法

子宮体癌のため手術を施行した患者の臨床経過と細胞株樹立に関する材料および方法は、次のごとくである。

1. 細胞株の樹立方法

1. 摘出材料

1) 症例・臨床的事項

患者は57歳の主婦で、主訴は不正性器出血、月経・妊娠歴は初経14歳、閉経52歳、7回妊娠・2回分娩 (人工妊娠中絶5回) であった。1987年6月、金沢大学医学部附属病院産科婦人科を受診し、子宮体癌、臨床進行期はIV b期と診断された。

平成6年3月2日受付、平成6年4月15日受理

Abbreviations: DCC, dextran-coated charcoal; DHA, dehydroepiandrosterone; E, estrogen; E₂, estradiol; EIA, enzyme immunoassay; ER, estrogen receptor; FBS, fetal bovine serum; Gy, gray; H-E, hematoxylin and eosin; MPA, medroxyprogesterone acetate; N/C, nucleus/cytoplasm; P, progesterone; Pap, Papanicolaou; PBS, phosphate-buffered saline; PR, progesterone receptor; T, testosterone

性器出血多量のため同年7月21日止血の目的で両側内腸骨動脈結紮術を行ない、同時に原発巣である子宮の単純全摘術と両側付属器摘出術を施行した。術後病理組織学的分類 (post-surgical tumor-node-metastasis classification, pTNM) では pT₁N₁M₁ で、子宮体部の低分化型腺癌と診断された。摘出腫瘍の ER および PR を酵素免疫測定法 (enzyme immunoassay, EIA) にて、アボット ER (PR)-EIA キット (Abbott Lab., North Chicago, IL, U.S.A.) を用いて測定したところ、ER 73fmol/mg タンパク (基準値 13fmol/mg), PR 31fmol/mg タンパク (基準値 10fmol/mg) であり、ER および PR は陽性であった。この手術標本の腫瘍部分より組織を採取し培養に供した。手術後抗癌剤による化学療法とメドロキシプロゲステロン・アセテート (medroxyprogesterone acetate, MPA) によるホルモン療法を行ない転移巣の縮小を認めたが、再度増悪し1989年4月に死亡した。

2) 摘出腫瘍の組織標本

子宮体部内膜細胞塗抹標本はパパニコロー (Papanicolaou, Pap) 染色、摘出腫瘍標本についてはヘマトキシリン・エオジン (hematoxylin and eosin, H-E) 染色を行ない光学顕微鏡にて観察した。それらの所見は次のごとくであった。

i. 細胞塗抹標本所見

著明に腫大した核を有する卵円形の細胞が多数認められ、これらの細胞は孤立性で、一部は軽度の重積性を呈していた。核/細胞質 (nucleus/cytoplasm, N/C) 比は大きく、核の形状は多様であった。クロマチンは増量し、細顆粒状に不規則な凝集を示し、核縁が肥厚していた。それぞれの核内には大きな赤染した核小体を1~2個認めた。また、細胞質はライトグリーンに好染し、レース状を呈していた (図1)。

ii. 組織診所見

大部分は充実性増殖を示しており、一部に不規則な腺様構造がみられた。腫瘍細胞は類円形の状態をとるものが多いが、核の異型性が強く、低分化型腺癌と診断された (図2)。

2. 培養方法

1) 初代培養

摘出子宮の体部より無菌的に腫瘍組織を採取し、0.15M 磷酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS) 中で洗浄し

た後、メスで細切して培養に供した。初代培養は組織片培養法に従い、20% の非働化牛胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) (Gibco, New York, U.S.A.) および硫酸カナマイシン (kanamycin sulfate) (明治製菓, 東京) 50μg/ml を含有するハム F12 培地 (Gibco) を使用して、37℃、湿潤、5% 炭酸ガス下に静置培養した。培養液は培養開始当初3日に1度、半量づつ交換した。

2) 継代培養

0.15M PBS に溶解した 0.02% エチレンジアミン 4 酢酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) (和光純薬, 大阪) と 0.1% トリプシン (trypsin) (Difco Lab., Detroit, Michigan, U.S.A.) 混合溶液にて細胞を剥離させ、1:2あるいは1:4に希釈して、上記の硫酸カナマイシン含有 20% 非働化 FBS 加ハム F12 培地で培養した。初代培養より約3か月後には FBS の濃度を 10% にした。

3. 細胞増殖速度

10% 非働化 FBS 加ハム F12 培地中における細胞増殖倍加時間は、その増殖曲線から求めた。すなわち、10⁵ 個の細胞を 3.5cm 径培養皿 (Falcon 3001, Becton Dickinson Lab., Lincoln Park, U.S.A.) に播き、2日おきに培地を交換した。一方、毎日3検体ずつ細胞を剥離し単個細胞として、0.4% ニグロシン (nigrosine) (和光純薬) で生体染色を行ない、血球計算板 (エルマ, 東京) を用いて生細胞数を計測し倍加時間を算出した。

4. 異種動物への移植

先天性胸腺欠損雌マウス (congenitally athymic female mouse) (BALB/C, nu/nu) (日本クレア, 東京) をアイソラック内で滅菌水とオリエンタル固形飼料 (オリエンタル酵母, 東京) で飼育した。実験には、7週齢以降で体重 20g 前後のものをを用いた。培養細胞 10⁵ 個または 10⁷ 個を 0.15M PBS 0.3ml に浮遊させ、20ゲージ注射針にて先天性胸腺欠損雌マウスの背面積皮下に刺入し移植した。

5. 形態観察

原発腫瘍および移植腫瘍については、10% 中性緩衝ホルマリン液で固定し、パラフィン包埋後切片を作成して H-E 染色を行なった。培養細胞については、位相差顕微鏡による観察のほか電子顕微鏡でも観察した。電子顕微鏡用標本の作製は、培養細胞を 1% グルタルアルデヒドと 4% ホルマリンの混合液

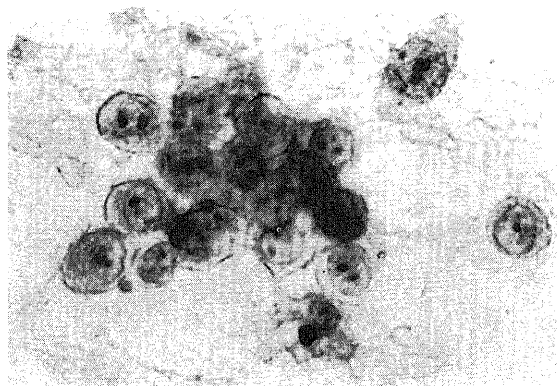


Fig. 1. Endometrial aspiration cytology of the original tumor. Nuclear enlargement and anisokaryosis are recognized. Note the overlapping of nuclei and thickening of nuclear membrane. Granular clump of chromatin, red macronucleoli are also observed. Papanicolaou stain, $\times 250$.

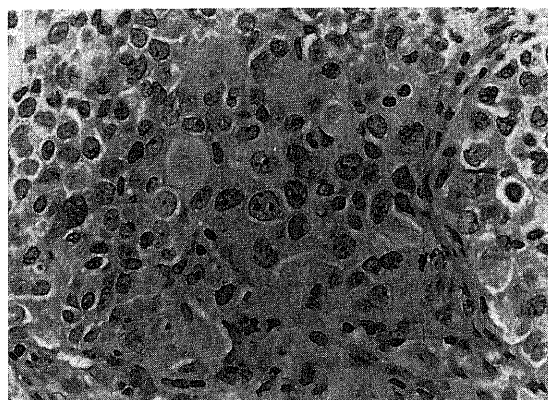


Fig. 2. Light micrograph of the original tumor. It shows the appearance of undifferentiated carcinoma. Glandular formations have particularly disappeared and the cells manifest bizarre atypical forms. The stroma is minimal in amount. Hematoxylin and eosin stain, $\times 200$.

(0.1M カコジル酸緩衝液で pH 7.4 に調整) で20分間前固定した。さらに、2% オスミウム酸 (0.1M カコジル酸緩衝液で pH 7.4 に調整) で1時間の後固定を行なったのち、上昇エタノール系列で脱水し、エポン812で包埋した。硬化させた後、試料をウルトラトームで超薄切片とし、酢酸ウラニル・硝酸鉛の二重染色を施した。観察には透過型電子顕微鏡 HU-11D 型 (75KV) (日立、東京) を用いた。

II. 樹立された細胞株の特性

1. 性ステロイドホルモンの感受性

培地における添加血清のステロイド除去の目的で、まず FBS をデキストラン・活性炭 (dextran-coated charcoal, DCC) で処理し、これを 10% の濃度で加えたハム F12 培地を作成した。その培地中に Sigma (St. Louis Mo., U.S.A.) より購入したエストラジオール (estradiol, E₂)、プロゲステロン (progesterone, P), テストステロン (testosterone, T), およびデヒドロエピアンドロステロン (dehydroepiandrosterone, DHA) を、それぞれ種々の濃度で添加した。ステロイドホルモンの溶解にはエタノールを用い、培地におけるエタノール最終濃度を 0.2% とした。なお、同培地に同一濃度のエタノールを添加したものを対照群とした。FBS の DCC 処理は次のごとく行なった。1g の活性炭 (Norit SX-3) (和光純薬) と 0.1g のデキストラン (Dextran T 70) (Pharmacia Fine Chemicals, AB Uppsala, Sweden) を 50ml の蒸留水に混ぜ、2000×g で10分間遠心分離し、上清を除いたものを DCC とした。この DCC を FBS 50ml と混合し、56℃30分間温浴した後 2000×g で15分間遠心分離し、上清 50ml をもう一度新しい DCC と混合し、さらに 37℃30分間温浴した。その後 2000×g で15分間遠心分離し、その上清を孔径 0.2μm のメンブランフィルター (Sartorius, Göttingen, Germany) にて濾過し、残存する DCC を除去して DCC 処理 FBS を得た。

培養細胞 10⁵ 個と 10% DCC 処理 FBS 加ハム F12 培地 2ml を培養皿 (Falcon 3001) に入れて培養を開始し、その後 2 日目にホルモン添加培地に交換した。さらに、その 4 日後に同じホルモン添加培地に交換し、ホルモン添加後 7 日目に前出の

方法で生細胞数計測を行なった。なお、各種性ステロイドの溶解にはエタノールを用いたが、細胞増殖の面では、エタノールを 0.2% の濃度で培地に添加した場合と未添加の場合の間で差は認められなかった。

2. 放射線感受性

培養細胞 2×10⁵ 個と 10% FBS 加ハム F12 培地 2ml を培養皿 (Falcon 3001) に入れ培養を開始し、その 4 日後にライナック (Linac) (10 MeV X-ray) ML-15M III (三菱電機、東京) により 10 グレイ (gray, Gy) を照射した。放射線照射後 14 日目、19 日目に Pap 染色による形態観察と前出の方法で生細胞数計測を 3 検体ずつ行なった。

III. 推計学的処理

計測値はすべて平均値±標準誤差 (mean±S.E.M.) で表示した。2 群間の差の検定には Mann-Whitney の U 検定を用い、 $p < 0.05$ をもって有意の差とした。

成 績

I. 腫瘍細胞の培養経過

1987年7月21日に初代培養を行なった。当初より線維芽細胞の増殖はほとんど認めなかったものの上皮性細胞の増殖も極めて遅く、同年9月に至り漸く継代培養を行なった。増殖は徐々に旺盛となり、その後クローニングを行なうことなく腫瘍細胞の培養系が得られ、1993年現在80代以上に達している。

II. 培養腫瘍細胞の性状

1. 増殖速度

増殖は比較的緩徐で48時間までは遅延期を示したが、以後13日目まで対数増殖期、その後定常期に移行した。対数増殖期における細胞倍加時間は72~140時間であった (図3)。

2. 異種動物への移植とその腫瘍組織像

BALB/C 系先天性胸腺欠損雌マウスの背面皮下に培養細胞を移植したところ、10⁵ 個の移植の場合には4か月後6匹中1匹に、10⁷ 個の移植の場合には2か月後6匹中5匹に、それぞれ固形腫瘍の形成を認めた (図4)。形成された腫瘍は、原発巣と同様の組織像を呈した。すなわち、腺様構造は一部に不規則に残存するものの、大部分は充実性増殖を示し、細胞形態・染色性・核の大きさは多様で、異型性が強く、核小体は明瞭で腫大

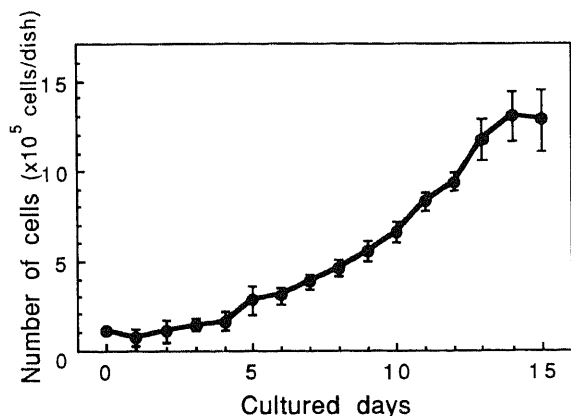


Fig. 3. Growth curve of the cultured cells. Cultured cells were seeded onto 3.5 cm culture dishes with Ham's F12 containing 10% heat inactivated FBS. Medium was changed every other day. Cell numbers were determined every day in 3 dishes for each time point, and results from all dishes were averaged. ●, mean of 3 dishes; bars, S.E.M.

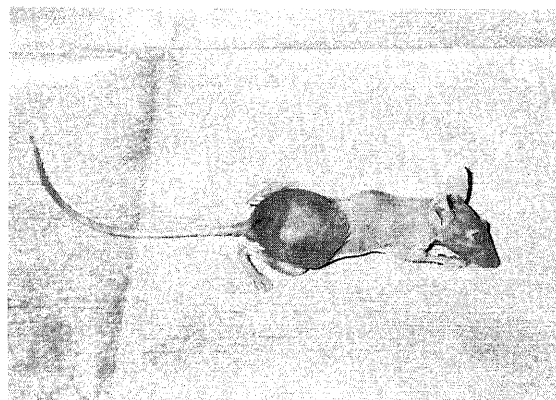


Fig. 4. Tumor formation in congenitally athymic female mouse. Approximately 10⁷ cells were injected subcutaneously into BALB/C, nu/nu, congenitally athymic female 7 week old mouse. Photo shows the mouse 2 months after tumor cell injection.

していた (図5)。

3. 光学顕微鏡所見

培養細胞の位相差顕微鏡所見としては、個々の細胞は楕円形ないし多稜形で、卵円形の核をもち、一部では多核・巨大核を呈し、N/C比は大であった。核内のクロマチン構造は細顆粒状を呈し、また、かなり大きな核小体がみられた。細胞の配列は上皮様敷石状を示すが、接触阻止はみられず容易に重積する傾向が認められた (図6)。

4. 電子顕微鏡所見

培養細胞においては、核の偏位がみられ、核縁の切れ込みが強く、大型の核小体が偏在していた。また、細胞内小器官の発達も悪かった。すなわち、ミトコンドリアは小型であり、小胞体は小型でかつ数も少なかった。ゴルジ装置の発達は乏しく、極性が乱れて核下部に認められるものが多かった。細胞間接着装置として接着斑 (desmosome) が認められた。細胞遊離縁には微絨毛 (microvilli) が認められたが、発達は悪かった (図7)。

Ⅲ. ステロイドホルモンに対する感受性

各種性ステロイドの培養細胞の増殖に及ぼす影響に関しては、図8に示した。ホルモン非添加の対照群に比し、 E_2 添加では、 10^{-10} ~ 10^{-6} M の濃度で有意の細胞数増加を示し ($p<0.05$)、 10^{-8} M の濃度で対照群の2.2倍と最大の効果を示した。しかし、

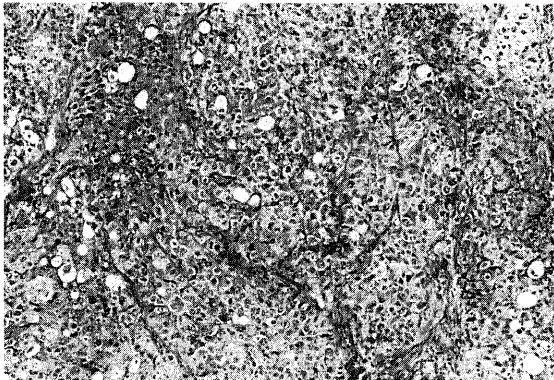


Fig. 5. Light micrograph of the tumor which developed in congenitally athymic mouse, showing histological appearance similar to the original tumor. Hematoxylin and eosin stain. $\times 125$.

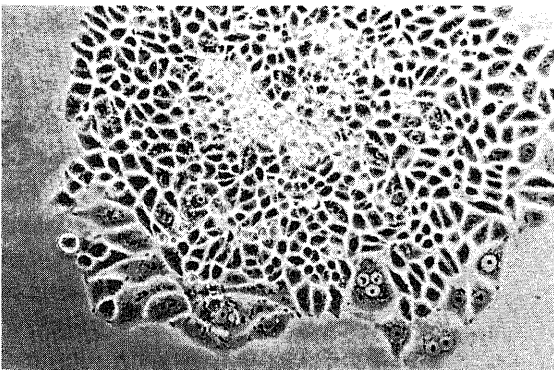


Fig. 6. Phase contrast microscopic findings of cultured cells. The cells grew as an epithelioid monolayer in a pavement-like arrangement, containing large nuclei with multiple nucleoli. Cytoplasm is not so abundant, and the cells are stacked without contact inhibition. $\times 150$.

10^{-7} M 以上の高濃度ではむしろ増加程度の減少が認められた ($p<0.05$)。P添加では、 10^{-10} M、 10^{-8} M と 10^{-6} M で有意に細胞数増加抑制効果がみられた ($p<0.05$) が、 10^{-8} ~ 10^{-6} M の濃度においては対照群との間に有意の差を認めなかった。T添加では、 10^{-10} ~ 10^{-6} M で有意の細胞数増加抑制効果がみられた ($p<0.05$) が、 10^{-7} ~ 10^{-6} M の濃度では対照群との間で差は認められなかった。DHA添加では、 10^{-10} ~ 10^{-6} M の濃度範囲で有意の細胞数増加が認められ ($p<0.05$)、その最大効果は 10^{-7} ~ 10^{-8} M であった。しかし、その効果は E_2 に比べて小さく、また、 10^{-8} M ではその効果の減弱化が認められた。

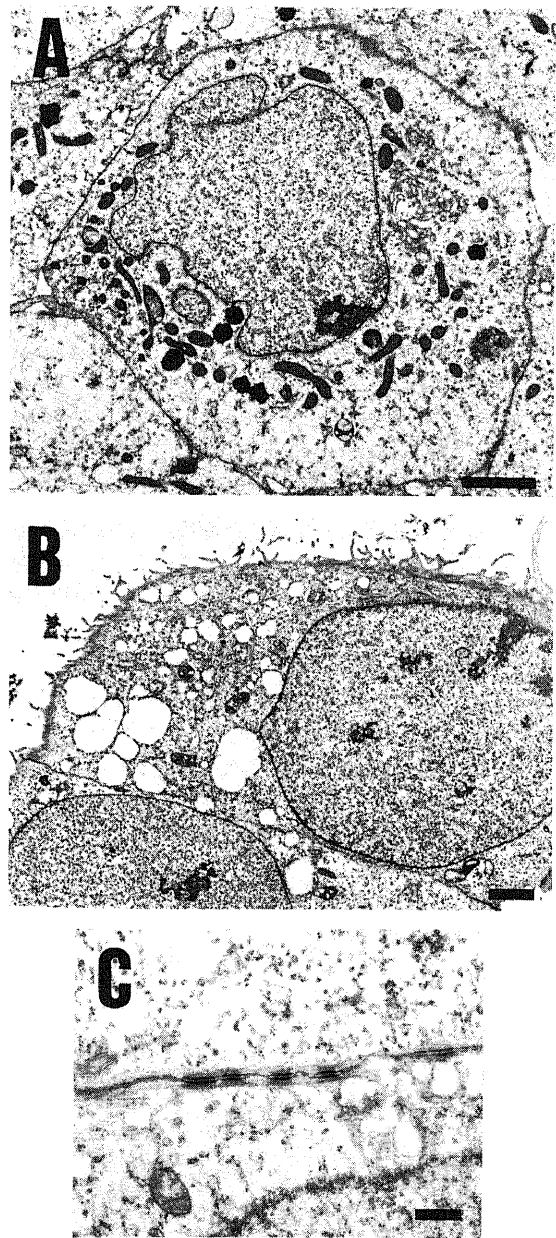


Fig. 7. Electron micrographs of cultured endometrial cancer cells. (A) Many mitochondria and sparse endoplasmic reticulum can be observed. Note irregular shaped nucleus with nucleolus. Scale bar indicates $2 \mu\text{m}$. (B) Microvilli are observed. Scale bar indicates $2 \mu\text{m}$. (C) As for intercellular junctions, desmosomes can be seen. Scale bar indicates $0.5 \mu\text{m}$.

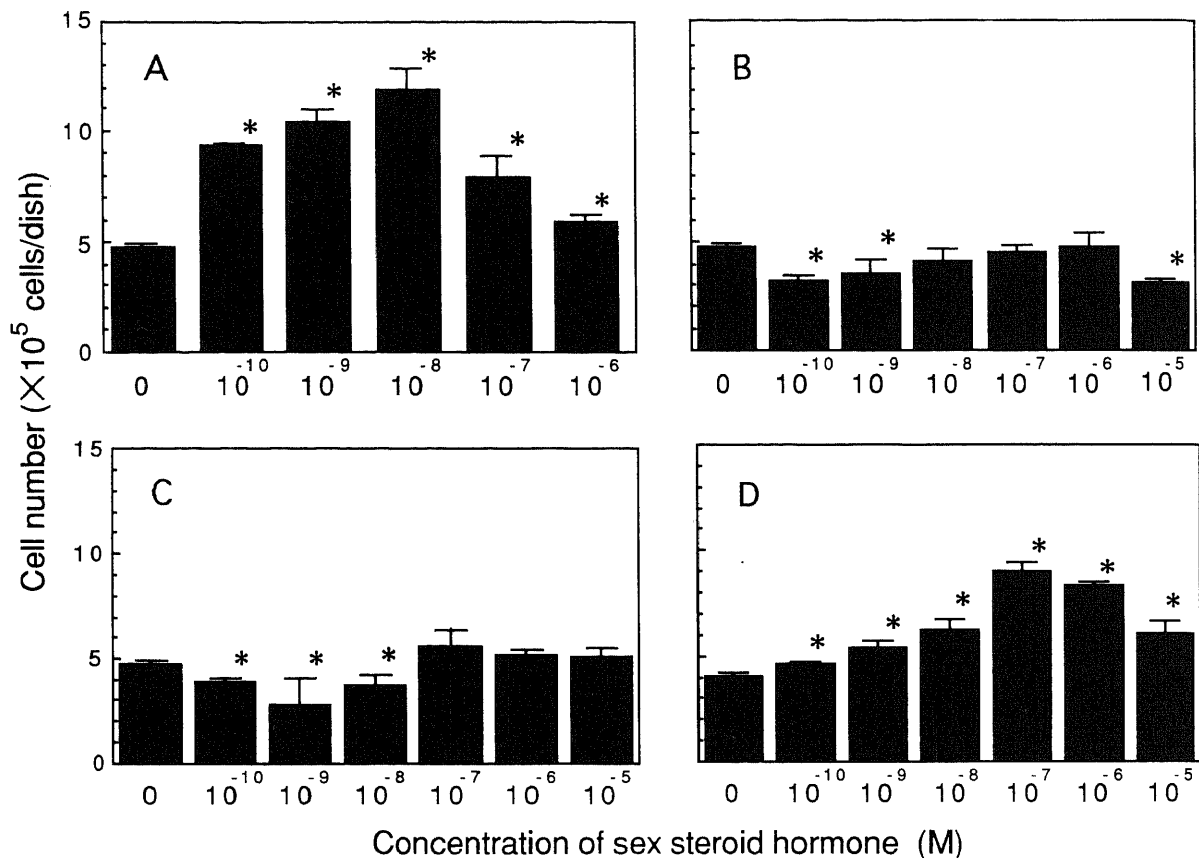


Fig. 8. Effects of sex steroid hormones on cell proliferation. A, E₂; B, P; C, T; D, DHA. Cells (10⁵/3.5 cm dish) were seeded in Ham's F 12 medium in the presence of 10% DCC-treated FBS. After 2 days in culture, medium was replaced by Ham's F 12 medium containing the indicated concentrations of steroid hormones. The 7th days later, cells from 3 dishes for each experimental group were counted in a hemocytometer. Columns, mean of 3 dishes; bars, S.E.M. Results are expressed as number of cells/dish. *, $p < 0.05$ by Mann-Whitney U test.

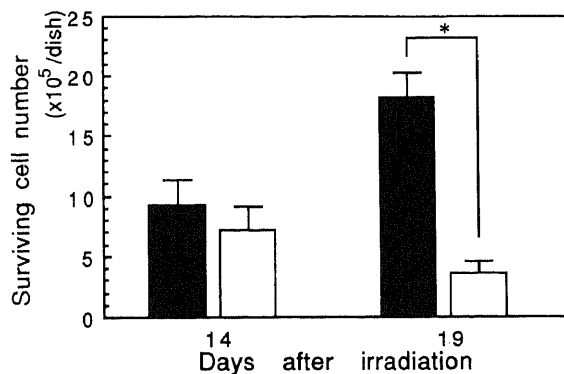


Fig. 9. Effects of irradiation on cell proliferation. Cells (10⁵/3.5 cm dish) were seeded in Ham's F 12 medium containing 10% heat inactivated FBS. After 4 days in culture, 10 Gy of irradiation was done. Cell numbers were counted in 14th and 19th day after irradiation. ■, control; □, 10 Gy irradiation. Columns, mean of 3 dishes; bars, S.E.M. *, $p < 0.05$ by Mann-Whitney U test.

IV. 放射線感受性

培養開始後4日目に10Gyの放射線照射を行なった。放射線照射後14日目における生細胞数は、対照群の $9.2 \pm 2.1 \times 10^5$ 個/培養皿に比し、 $7.2 \pm 1.9 \times 10^5$ 個/培養皿と減少傾向を示し、19日

目では対照群の $18.2 \pm 2.1 \times 10^5$ 個/培養皿に比し、 $3.6 \pm 1.0 \times 10^5$ 個/培養皿と有意に減少していた ($p < 0.05$) (図9)。

放射線照射が奏効した細胞では、細胞質が淡染性となり細胞質・核の空泡変性、核の膨大がおり、また核型がさらに不規則になった。

考 察

ヒト癌細胞培養株については、Gey ら²⁰⁾により樹立された株細胞 HeLa を嚆矢とするが、これが世界的に普及し研究に利用されてきた。その後も種々の臓器の腫瘍より培養細胞株が樹立されてきており²¹⁻²³⁾、これらは癌の治療法の開発や生化学、免疫学などの基礎的研究に応用され、ヒト癌の生物学的特性を知る上で大きな役割を果たしている。子宮体癌については、我が国においても平均寿命の延長および食生活の欧米化、ひいては内分泌環境の変化に伴い、乳癌や卵巣癌などと共に近年増加しつつある癌として注目されている。

また、子宮体癌の生物学的特性解明のために多くの子宮体癌細胞株の樹立が望まれており、その試みがなされている。子宮体癌株は Kuramoto ら¹⁾や Nishida ら³⁾により樹立されているが、低分化型腺癌についての報告は少ない⁵⁾。子宮体癌の予後は組織学的種類・悪性度によって大きく左右されるので、培養株細胞においてもより多くのものが樹立され、それらの特性について研究されることが望まれている。この点においても今回の

新しい細胞株の樹立は意義のあるものと考えられる。なお、日本組織培養学会の組織培養細胞株名登録規程の中には、その登録受付基準として「細胞株は1年以上、および50代以上継代した細胞」と記載されているが、今回培養を続けているこの細胞株もすでに5年以上、80代以上の経過しており、この基準を満たしている。

まず、今回の初代培養についてであるが、摘出腫瘍をメスで細切した後シャーレに貼り付ける方法をとった。この方法は酵素分散法のように細胞が傷害を受けることも少なく、組織片が基質に付着しやすい場合には非常に簡便で有効な方法とされている²¹⁾。培養液とそれに加える血清については、Eagleの最少必須培地に20%自家血清を加えるのが最もよいとされている²²⁾が、ヒト培養細胞においては自家血清で培養を続けることは不可能であり、多くはFBSまたは仔牛血清(calf serum)を用いており、本研究においてもそれに倣った。培養液に関しては、樹立細胞株においてはその違いは少ないと言われており、樹立維持されている子宮体癌株の培地も様々である。今回の継代培養にはHam F12を使用した。

今回培養した子宮体部腫瘍は、その病理学的所見から低分化型腺癌と診断されたが、腺様構造は極めて不明瞭で大部分が充実性増殖を示していた。細胞の形態、染色性、核の大きさなどは多様性を示し、異型性が強くみられた。また、ホルモン受容体については、ERおよびPRの陽性率は高分化型で高く、低分化型では一般に低いとされている²³⁾が、今回の原発腫瘍は低分化型であったが、ER、PRともに陽性であった。

初代培養に用いられる摘出腫瘍には、癌細胞の他に間質細胞をはじめ何種類かの細胞が含まれている可能性がある。特に、線維芽細胞の混在が細胞株樹立に際して問題となる。本例では、初代培養より培養線維芽細胞の形態を示す細胞の混入は認められなかった。なお、培養細胞は楕円形～多稜形細胞で、数石状に配列していたが一部重積性を持ち、しかも電子顕微鏡所見では密着結合(tight junction)や接着斑などの細胞間接着装置が認められ、上皮系細胞の特徴を示していた。また、発達は悪いが細胞遊離縁には微絨毛が認められ、腺系細胞の特徴も残していた。さらに、N/C比の増大、核の多形性、著明な核小体などの形態学的に悪性の条件を満たしていた。

得られた培養細胞が、癌細胞に特有の性格を有するかどうかを同定する方法としては、従来より種々の方法が用いられてきている。そのうち、最も信頼性が高いのは異種移植による腫瘍の再現性をみる方法である。今回の細胞培養株は、先天性胸腺欠損マウスへの異種移植が可能で、組織学的には原腫瘍・移植腫瘍ともに低分化型腺癌であり形態学的にもよく類似していた。一般に分化型の細胞株は継代培養を続けることによって低分化型へ変化していく現象がみられ、増殖するに伴い、いくつかの異なる性質を持ったクローンが出現してくる可能性について報告されている¹⁾。今回の細胞株については、現在まで何回か先天性胸腺欠損雌マウスへの移植を行なって検討しているが、いずれも移植腫瘍と原腫瘍の組織像はよく類似していた。

細胞増殖に及ぼす各種性ステロイドの影響については、その濃度によって増殖促進あるいは抑制作用が認められ、それぞれに最適濃度の存在する可能性が示唆された。Eと体癌の関連については、欧米において更年期以降の女性に対してよく行なわれている長期のE単独補充療法(estrogen replacement therapy, ERT)は体癌の危険度を4～8倍に増加させると報告

されている^{24)~26)}。また、体癌細胞培養系についても、増殖因子などを含まない無血清培地においてE₂の添加によって増殖が亢進すると報告されており、今回の樹立細胞株でもE₂の成熟期女性の生理的血中濃度相当の範囲内で著明に増殖の亢進することが認められた。この成績は子宮体癌細胞株であるIshikawa株におけるHolinkaら²⁷⁾の成績と同様であった。

プロゲステロンに関しては、Ishikawa株ではMPAが癌細胞内の自己増殖因子である腫瘍増殖因子 α (transforming growth factor- α , TGF- α)の遺伝子に直接作用して、mRNAを減少させることにより細胞増殖を抑制すると報告されている²⁸⁾。しかし、MPA投与によっても腫瘍の縮小が認められない例も存在することから、臨床的に認められる抗腫瘍効果について、西田ら²⁹⁾は内膜癌細胞周囲の間質を機能的に障害することにより、癌細胞への栄養供給が絶たれ抗腫瘍効果として現われるのではないかと推察している。また、Pの作用についても、高濃度(10^{-5} M)で長時間細胞と接触して初めて作用を示すことから、その増殖抑制作用はホルモン作用ではなく薬理作用ではないかと推察している。今回の樹立細胞株では、Pの増殖抑制効果は 10^{-5} Mの濃度で最も強く認められた。また、 10^{-8} ～ 10^{-6} Mの濃度では対照群と差を認めないものの、 10^{-10} ～ 10^{-9} Mの濃度では増殖抑制効果が認められた。このような低濃度で認められた増殖抑制効果は、他の子宮体癌細胞株では報告されていない。この点から、本細胞株は特にPに感受性を有するものと考えられ、その増殖抑制には最適濃度の存在することが示唆された。なお、高濃度における増殖抑制効果はホルモン作用によらない細胞毒性によるものと推察された。

アンドロゲンの細胞増殖に及ぼす影響については、Centola³⁰⁾によると、Tでは $0.5\mu\text{g/ml}$ (10^{-6} M)の濃度の場合、子宮体癌細胞(034株)の増殖をわずかに促進、 $5\mu\text{g/ml}$ (10^{-5} M)の場合には反対にわずかに抑制し、また、合成男性ホルモン剤メチルトリエノロン(methyltrienolone)では、 $0.5\sim 10\mu\text{g/ml}$ ($10^{-6}\sim 10^{-5}$ M)で同細胞株において著明に増殖を抑制したとしている。合成男性ホルモン剤の場合には、E₂に変換されないことから細胞に直接作用し抑制したものであり、一方T添加の場合にみられた増殖促進作用については、 $0.5\mu\text{g/ml}$ 添加培養後に培地中のE₂濃度の上昇がみられたことから癌細胞内のアロマトラーゼ(aromatase)によりE₂に変換されたためではないかと推察している。今回の樹立細胞株では、T濃度 $10^{-10}\sim 10^{-5}$ Mの範囲で検討したところ、 $10^{-9}\sim 10^{-8}$ Mの濃度で最も強い抑制効果を示したが、 $10^{-7}\sim 10^{-6}$ Mの濃度では対照群との間に有意差を認められず、また、いずれの濃度においてもCentolaの報告にあるような増殖促進作用は認められなかった。

一方、DHAの細胞増殖に及ぼす影響について詳細に検討した報告は、現在のところ必ずしも多くない。DHAは弱いアンドロゲン作用を有するとされ、成人女性の1日産生量は $15\sim 20\text{mg}$ 、その血中濃度は $1.5\sim 6.0\text{ng/ml}$ と報告されており³¹⁾、女性ではその大部分が副腎より産生されている。しかし、その作用や産生調節機序については、なお未解明の点が多い。DHAと子宮体癌の発生との関係についての調査・研究も行なわれているが、現在なお明確な結論が得られていない^{32,33)}。細胞培養系を使用したこれまでの実験報告では、DHAがZR-75-1乳癌細胞の増殖を促進したとする報告³⁴⁾があり、それによると、DHAがプレホルモン(prehormone)としてE、T、その他の

ホルモンへ代謝変換され増殖作用を示したとしている。今回の樹立細胞では 10^{-7} ~ 10^{-8} M の濃度で増殖促進が最大であった。この濃度は正常女性の血中濃度の 10^2 ~ 10^3 倍に相当するものであるが、組織内濃度が血中濃度より高いという報告もある³⁵⁾。今回の実験成績からみた限りでは、本株細胞に対して DHA は細胞増殖に促進的に働くものと考えられた。しかし、DHA が細胞増殖を抑制したとする Dworkin ら³⁶⁾ の報告では、ヒト線維芽細胞 WI-38 や子宮頸癌細胞株 HeLa 等の細胞に対して抑制的に働き、その抑制がヌクレオシド (nucleoside) の添加によって解除されることから、グルコース-6-リン酸脱水素酵素 (glucose-6-phosphate dehydrogenase) を抑制することによる核酸合成の抑制がその原因であるとしている。したがって、DHA について得られた今回の結果が、樹立細胞株のみにみられる特異的なことなのか、あるいは DHA の直接的作用によるものなのか、代謝変換されたホルモンの間接的な作用によるものなのかについては今後検討すべき課題と考えられた。

放射線の殺細胞効果の機序は詳細は不明であるが、DHA の損傷によるものと考えられている。放射線により細胞死に至るものと、損傷は受けるものの致死性ではない亜致死的損傷と、回復をみせる潜在的致死損傷のあることが知られている³⁷⁾。また、放射線感受性については、同一組織型由来のヒト腫瘍培養細胞でも細胞株ごとに放射線感受性が異なることが指摘されている³⁸⁾。治療面では、一般に 1 回分割線量 2Gy が標準とされているが、今回の 10Gy 1 回照射で対照群と比較した結果では、照射後 2 週目ごろから細胞数の減少がみられ、照射後 19 日目には対照群の約 1/5 に減少し、増殖速度の減退が認められた。これは X 線照射により細胞の増殖能が減退し、活性の落ちた状態で生存しているものと推定された。

以上、今回樹立した細胞株は低分化型子宮体癌由来で 5 年以上継代を続けており、接触阻止を起こすことなく増殖し、形態学的にも細胞学的悪性基準を満たしていた。なお、各種性ステロイドホルモンの細胞増殖に及ぼす影響の検討から、 E_2 と DHA は増殖促進的に、T と P は抑制的に作用し、それらの作用には至適濃度の存在することが示唆された。また、他の性状検索の結果からも、本細胞株はヒト子宮体癌の特性を知る上で有用な細胞株のひとつと考えられた。

結 論

57 歳の子宮体癌患者より採取した腫瘍組織から継代可能な細胞株を樹立した。その細胞株の性状と性ステロイドホルモン感受性、放射線感受性について検討し、以下の結論を得た。

1. 手術摘出標本の組織型は顕微鏡所見より低分化型腺癌であった。腫瘍組織から細胞培養を行ない得られた株細胞は、10% 非働化 FBS 添加ハム F12 を培地として静置培養されており、現在も安定した増殖を示している。
2. 増殖倍加時間は 72~140 時間であった。
3. 先天性胸腺欠損雌マウスへの細胞移植により腫瘍の形成が認められ、その組織像は原腫瘍と一致していた。
4. 細胞は類円形~多稜形で敷石状に増殖し容易に重積する。電子顕微鏡所見では、核縁の不整がみられ、大型の核小体が偏在し、細胞内小器官の発達が悪かった。
5. 細胞の増殖は、 10^{-10} ~ 10^{-8} M 濃度の E_2 添加で促進され、その効果は 10^{-8} M の濃度で最も大であった。DHA の添加でも、 10^{-10} ~ 10^{-8} M の濃度で増殖の促進がみられたが、その効

果は、 E_2 には及ばなかった。P の添加では 10^{-10} M、 10^{-8} M と 10^{-6} M の濃度で、T の添加では 10^{-10} ~ 10^{-8} M の濃度で増殖が抑制された。これら性ステロイドの効果には、それぞれに至適濃度の存在する可能性が示唆された。

6. 放射線 10Gy 1 回照射により、培養細胞の増殖抑制が認められた。

以上、子宮体部低分化型腺癌由来の細胞株を樹立し、その性状について検討した。

謝 辞

稿を終えるに当たり、御指導と御校閲を賜りました西田悦郎教授に謹んで謝意を表します。また、本研究の遂行に当たり貴重な御助言を賜りました本学がん研究所免疫生物部高橋守信教授に深謝致しますとともに、終始ご指導頂きました赤祖父一知助教授ならびに研究面で御協力頂きました寺田督講師、橋本茂博士はじめ教室員各位、並びに穴田幸子、相川みち代事務官に深く感謝致します。

なお、本論文の要旨の一部は第 63 回日本内分泌学会学術総会 (1990 年、大阪) において発表した。

文 献

- 1) Kuramoto, H., Tamura, S. & Notake, Y.: Establishment of a cell line of human endometrial adenocarcinoma in vitro. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 114, 1012-1019 (1972).
- 2) Nishida, M., Kasahara, K., Kaneko, M., Iwasaki, H. & Hayashi, K.: Establishment of a new human endometrial adenocarcinoma cell line, Ishikawa cells, containing estrogen and progesterone receptors. *Acta Obstet. Gynecol. Jpn.*, 37, 1103-1111 (1985).
- 3) Way, D. L., Grosso, D. S., Davis, J. R., Surwit, E. A. & Christian, C. D.: Characterization of a new human endometrial carcinoma (RL-95-2) established in tissue culture. *In Vitro*, 19, 147-158 (1983).
- 4) Boyd, J. A., Siegal, G. P. & Kaufman, D. G.: Establishment and characterization of a human cell line from a serous papillary endometrial carcinoma. *Gynecol. Oncol.*, 33, 301-312 (1989).
- 5) Morisawa, T., Kuramoto, H., Simoda, T., Hamano, M., Kato, Y. & Hata, H.: Establishment and characterization of HEC-108 cell line from a poorly differentiated adenocarcinoma of the uterine corpus. *Human Cell*, 1, 332 (1988).
- 6) 鎌田七男, 田中公男: 人癌培養株と染色体異常. 組織培養, 6, 473-485 (1980).
- 7) 関口守正, 鈴木利光: わが国で維持されている人癌由来細胞株. 組織培養, 6, 527-548 (1980).
- 8) 佐藤 博: 日本で維持されている「可移植性腫瘍株」一覧表. 癌と治療, 11 (Part II), 1-92 (1984).
- 9) Moore, T. D., Phillips, P. H., Norenstone, S. R. & Cheson, B. D.: Systemic treatment of advanced and recurrent endometrial carcinoma: Current status and future directions. *J. Clin. Oncol.*, 9, 1071-1088 (1991).
- 10) Holinka, C. F., Hata, H., Kuramoto, H. & Gurpide, E.: Effects of steroid hormones and antisteroids on alkaline phosphatase activity in human endometrial cancer cells (Ishikawa line). *Cancer Res.*, 46, 2771-2774 (1986).

- 11) Hata, H. Hata, K. Hamano, M., Shimoda, T. & Kuramoto, H.: Responsiveness and action mechanisms of steroid hormones in human endometrial adenocarcinoma cells. *Human Cell*, **2**, 265-271 (1989).
- 12) 山本 宝, 岡田弘二: 子宮体癌 (ホルモンとの関係). *Oncol. Chemother.*, **7**, 359-363 (1991).
- 13) 岡田弘二: 子宮体癌研究. 婦人科悪性腫瘍研究会会誌, **1**, 82-89 (1985).
- 14) Anderson, D. G.: Management of advanced endometrial adenocarcinoma with medroxyprogesterone acetate. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **92**, 87-99 (1985).
- 15) Kennedy, B. J.: Progestogens in the treatment of carcinoma of the endometrium. *Surg. Gynecol. Obstet.*, **127**, 103-114 (1968).
- 16) Kline, R. C., Freedman, R. S., Jones, L. A., Atkinson, E. N.: Treatment of recurrent or metastatic poorly differentiated adenocarcinoma of the endometrium with tamoxifen and medroxyprogesterone acetate. *Cancer Treat. Rep.*, **71**, 327-328 (1987).
- 17) Gal, D., Forney, J. P., Dev, V. G. & Porter, J. C.: A new human cell line derived from a poorly differentiated endometrial adenocarcinoma. *Gynecol. Oncol.*, **13**, 50-57 (1982).
- 18) Gong, Y., Ballejo, G., Murphy, L. C. & Murphy, L. J.: Differential effects of estrogen and antiestrogen on transforming growth factor gene expression in endometrial adenocarcinoma cells. *Cancer Res.*, **52**, 1704-1709 (1992).
- 19) 佐藤文三: ステロイドホルモンの細胞増殖作用と増殖因子. 代謝, **22**, 1045-1053 (1985).
- 20) Gey, G. O., Coffman, W. D. & Kubicek, M. T.: Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.*, **12**, 264-265 (1952).
- 21) 松谷 豊: 動物細胞培養法入門. 生物化学実験法29 (瓜谷郁三, 駒野 徹, 志村憲助, 中村道徳, 船津 勝編), 第1版, 77-81 頁, 学会出版センター, 東京, 1993.
- 22) Cobb, J. P. & Walker, D. G.: Effects of heterologous, homologous and autologous serums on human normal and malignant cells in vitro. *J. Natl. Cancer Inst.*, **27**, 1-9 (1961).
- 23) Kauppila, A. J. I., Isotalo, H. E., Kivinen, S. T. & Vihko, R. K.: Prediction of clinical outcome with estrogen and progestin receptor concentrations and their relationships to clinical and histopathological variables in endometrial cancer. *Cancer Res.*, **46**, 5380-5384 (1986).
- 24) Smith, D. C., Prentice, R., Thompson, D. J. & Hermann, W. L.: Association of exogenous estrogen and endometrial adenocarcinoma. *N. Engl. J. Med.*, **293**, 1164-1167 (1975).
- 25) Mack, T. M., Pike, M. C., Henderson, B. E., Pfeffer, R. I., Gerkins, V. R., Arthur, M. & Brown, S. E.: Estrogens and endometrial cancer in a retirement community. *N. Engl. J. Med.*, **294**, 1262-1267 (1976).
- 26) Henderson, B. E., Ross, R. & Bernstein, L.: Estrogens as a cause of human cancer: The Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award Lecture. *Cancer Res.*, **48**, 246-253 (1988).
- 27) Holinka, C. F., Anzai, Y., Hata, H., Kimmel, N., Kuramoto, H. & Gurdip, E.: Proliferation and responsiveness to estrogen of human endometrial cancer cells under serum-free culture conditions. *Cancer Res.*, **49**, 3297-3301 (1989).
- 28) Gong, Y., Anzai, Y., Murphy, L. C., Ballejo, G., Holinka, C. F., Gurdip, E. & Murphy, L. J.: Transforming growth factor gene expression in human endometrial adenocarcinoma cells: Regulation by progestins. *Cancer Res.*, **51**, 5476-5481 (1991).
- 29) 西田正人, 笠原国武, 辻 泰二: 子宮体癌に対する黄体ホルモン製剤の作用機序について. 日産婦会誌, **38**, 2214-2215 (1986).
- 30) Centola, G. M.: Inhibition of endometrial carcinoma cell cultures by a synthetic androgen. *Cancer Res.*, **45**, 6264-6267 (1985).
- 31) Bird, C. E., Murphy, J., Boroomand, K., Finnis, W., Dressel, D. & Clark, A. F.: Dehydroepiandrosterone: kinetics of metabolism in normal men and women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **47**, 818-822 (1978).
- 32) Carlstrom, K., Damber, M., Furuholm, M., Joelsson, I., Lunell, N. & Schoultz, B.: Serum levels of total DHA and total estrone in postmenopausal women with special regard to carcinoma of the uterine corpus. *Acta obstet. Gynecol. Scand.*, **58**, 178-185 (1979).
- 33) Pettersson, B., Bergström, R. & Johanson, E. O. B.: Serum estrogens and androgens in women with endometrial carcinoma. *Gynecol. Oncol.*, **25**, 223-233 (1986).
- 34) Poulin, R. & Labrie, F.: Stimulation of cell proliferation and estrogenic response by adrenal C₁₉- Δ^5 -steroids in the ZR-75-1 human breast cancer cell line. *Cancer Res.*, **46**, 4933-4937 (1986).
- 35) Wiegerinck, M. A. H. M., Poortman, J., Donker, T. H. & Thijssen, J. H. H.: In vitro uptake and subcellular distribution of tritium-labeled estrogens in human endometrium, myometrium and vagina. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **56**, 76-81 (1983).
- 36) Dworkin, C. R., Gorman, S. D., Pashko, L. L., Cristofalo, V. J. & Schwartz, A. G.: Inhibition of growth of HeLa and WI-38 cells by dehydroepiandrosterone and its reversal by ribo- and deoxyribonucleosides. *Life Sci.*, **38**, 1451-1457 (1986).
- 37) Phillips, R. A. & Tolmach, L. J.: Repair of potentially lethal damage in X-irradiated HeLa cells. *Radiat. Res.*, **29**, 413-432 (1966).
- 38) Deacon, J., Peckham, M. J. & Steel, G. G.: The radioresponsiveness of human tumours and the initial slope of the cell survival curve. *Radiother. Oncol.*, **2**, 317-323 (1984).

Establishment and Characterization of a Human Poorly Differentiated Endometrial Carcinoma Cell Line

Mitsunori Kato, Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-J. J. J. Med. Soc., 103, 576-584 (1994)

Key words endometrial carcinoma, established cell line, sex steroid hormone, radiation

Abstract

A cell line was established from the operation specimen of human endometrial poorly differentiated adenocarcinoma taken from a 57 year old woman. The morphology, growth pattern, effects of sex steroid hormones, and radiation effects on the proliferation of the cells from the established cell line were examined. The cells have grown well without interruption for over 5 years and have subcultivated over 80 generations. These cells were cultured with Ham's F 12 containing 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS) at 37°C under humidified 5% CO₂ and 95% air. The doubling time for this cell line was 72~140 hours. The monolayer cultured cells appeared epithelial, showing a pavement-like arrangement and piling up tendency without contact inhibition. By heterotransplantation to a congenitally athymic female mouse, the developed tumor resembled the original tumor. The effects of sex steroid hormones on the proliferation of these cells were studied by estimating the cell growth. Cells used for this experiments were cultured in Ham's F 12 medium containing 10% dextran coated charcoal treated FBS. The addition of 10⁻¹⁰~10⁻⁶M of estradiol (E₂) to the medium resulted in a significant increase in cell numbers compared with the control (p<0.05) and the maximum effect of E₂ appeared at 10⁻⁸M. The addition of 10⁻¹⁰~10⁻⁵M of dehydroepiandrosterone (DHA) to the medium resulted in increase in cell numbers compared with the control (p<0.05). The maximum effect of DHA appeared at 10⁻⁷~10⁻⁶M. But the activation effect of DHA on cell proliferation was less than that of E₂. The addition of 10⁻¹⁰M, 10⁻⁹M and 10⁻⁸M of progesterone (P) to the medium resulted in a decrease in cell numbers compared with the control (p<0.05) and the addition of 10⁻¹⁰~10⁻⁸M of testosterone (T) to the medium also resulted in a decrease in cell numbers compared with the control (p<0.05). As for the radiosensitivity of these cells, cells were cultured in Ham's F 12 medium containing 10% heat inactivated FBS for 4 days and then irradiated with a single dose of 10 Gy. Nineteen days after irradiation, the cell numbers had decreased compared with the nonirradiated control (p<0.05). As mentioned above, a cell line derived from poorly differentiated endometrial carcinoma was established, and the cell growth was enhanced by E₂ and DHA, and was suppressed by P, T and irradiation.